

Studien
zum elektrophoretischen und
immunelektrophoretischen Nachweis
von DNase-Aktivitäten
im Patientenserum

von

HELGA HAUK

Frankfurt am Main 1965

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. K. Herzberg

Studien zum elektrophoretischen und immunelektrophoretischen Nachweis von DNase-Aktivitäten im Patientenserum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Zahnmedizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Helga Hauk
aus Kaiserslautern

Frankfurt am Main 1965



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</u>	1
II. <u>DIE METHODIK</u>	4
1. Möglichkeiten zur Darstellung von Proteinen	4
2. Durchführung der eigenen Versuche	6
a) Die Immunelektrophorese	6
b) Die DNA-Platte	6
c) Die Kombination der Immunelektrophorese mit dem DNase-Nachweis auf DNA-Platten	7
3. Eigene Versuche	8
a) Die Immunpräzipitate	8
b) Die Höfe auf der DNA-Platte	11
III. <u>DIE ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN</u>	12
IV. <u>DISKUSSION</u>	29
V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	31
<u>LITERATUR</u>	32



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551901_0083

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Zahlreiche im menschlichen Blutserum enthaltene Proteine (mehr als 80) konnten in letzter Zeit durch physikalisch-chemische Methoden näher charakterisiert werden, sodaß heute "das Bluteiweißbild gleichberechtigt neben dem cellulären Blutbild" steht (Wuhrmann). Eine generelle Unterteilung der Eiweißkörper des Blutserums in Albumine und Globuline basiert auf ihrer verschiedenen Fällbarkeit durch Salze. Rund 60% der Gesamt-Serumproteine bestehen aus Albumin. Die Bedeutung dieses Proteins liegt in seiner Eigenschaft als Regulator eines konstanten kolloidosmotischen Druckes im Gefäß- und Kapillarsystem sowie in seiner Funktion als Transportmittel (Bennhold 1938) für zahlreiche körpereigene und -fremde Substanzen. Schließlich stellt es ein Eiweißreservoir des Körpers dar, das im Eiweißstoffwechsel eine besondere Rolle spielt. Der Einheitlichkeit des Serumalbumins steht eine Vielfalt verschiedener Globuline gegenüber. Vor allem durch elektrophoretische Trennung gelang eine Gruppierung in α , β , und γ -Globuline. Der menschliche Organismus verfügt über eine Gruppe von Abwehrstoffen, die besonders dadurch charakterisiert sind, daß sie erworben sind und daß sie eine besondere Spezifität besitzen. Diese sog. Antikörper sind nun in der γ -Globulinfraktion enthalten, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden. Die α - und β -Globuline sind weit weniger definiert in ihrer Funktion. Sie spielen jedoch in mannigfachen Blut-Reaktionen eine Rolle z.B. in den Blutgruppen-Agglutininen, oder im Komplex des Blutgerinnungssystems. Im normalen Blutserum sind ebenfalls Fermentsysteme vorhanden, wie z.B. Zymohexase, Isomerase, Hydrogenase (Warburg, Christian) und auch Desoxyribonucleasen (DNase) (Zahn). Es handelt sich hierbei um Proteine, die normalerweise mit übrigen Blutproteinen eine physikalisch-chemische Einheit bilden, d.h. nur durch die Enzym-Substrat-Reaktion lassen sie sich nachweisen. Bei wechselnder Reaktionslage des Organismus kann, den Ablauf von klinischen Krankheitsbildern spiegelnd, eine Veränderung des Bluteiweißgehaltes entstehen. Man spricht von einem "Fluktuieren der Proteine" (Wuhrmann). Als Antwort auf Infektionen durch Mikroorganismen z.B., kann die Eiweißbildung übermäßig angeregt werden (Hyperproteinämie), oder es kann eine mangelhafte Bildung ein-

treten als Folge gestörter Genese, ungenügender Eiweißaufnahme oder infolge Stoffwechsel-Defekten (Hypoproteinämie). Neben diesen Änderungen im Blutspiegel, wie sie sich durch die Serumkonzentrationen zu erkennen geben, verläuft oft auch eine Änderung im qualitativen Sinne. Bei Dysproteinämien und Paraproteinämien, die vorwiegend den Globulinbereich betreffen, wurden Beziehungen zu malignen Tumoren, vor allem zu den Plasmozytomen, sowie zu Leukämien, Sarkomen und auch zu Karzinomen nachgewiesen. Diese Tatsache beginnt interessant zu werden, wenn man bedenkt, daß einige Autoren die beschleunigte zelluläre Entwicklung in engen Zusammenhang bringen mit der Tätigkeit der Fermentsysteme. Brody 1958 z.B. zeigte, daß eine experimentell erzeugte Carcinogenese, die wie jedes beschleunigte zelluläre Wachstum mit einer Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Vermehrung verbunden ist, wahrscheinlich auf eine Desoxyribonuclease (DNase)-Aktivitätserhöhung zurückzuführen ist. Sollte in diesem Falle pathologischerweise eine Veränderung der komplexen Fermentsysteme im Blutserum auftreten? Es steht fest, daß die DNase in sehr niedrigen Konzentrationen eine anregende Wirkung auf den Zellteilungsmechanismus ausüben kann, wohl, indem sie DNA teilweise abbaut und daß andererseits sich durch DNA-Injektion beim Warmblüter (Kaninchen) DNase-Aktivitätserscheinungen hervorrufen lassen (Zahn 1958). Eine Beziehung zwischen beschleunigter Zellteilung bei pathologischen Wucherungsprozessen und einer erhöhten Aktivitätsentfaltung der DNasen bzw. dem vermehrten Auftreten des aktiven Fermentes im menschlichen Serum ist in diesem Zusammenhang denkbar. Hier wird diese Annahme als Arbeitshypothese benutzt, um zu versuchen, DNase-Aktivitäten nachzuweisen. Eine quantitative Bestimmung kann erlauben, Werte beim Gesunden mit solchen von Patienten mit bestimmten Krankheiten zu vergleichen. Es ergeben sich mehrere Möglichkeiten des DNase-Nachweises:

- 1.) Die Viskositätsmessung: bei Zugabe von DNase nimmt eine außerordentlich visköse DNA-Lösung eine leichtflüssige Konsistenz an. Die DNase wirkt depolymerisierend auf die langfädigen Makromoleküle der Desoxyribonucleinsäure.
- 2.) Die Prüfung der UV-Absorption: nicht abgebaute DNA in Lösung zeigt eine geringere Absorption bei 260m im Vergleich mit degradiertem DNA gleicher Menge; man benutzt den hypochromen

Effekt nativer DNA, um DNase-Aktivitäten zugesetzten Serums zu studieren.

3.) Die Messung der DNase-Aktivität durch Diffusion in einem DNA-haltigen Agar und Nachweis der Zonen von DNA-Abbau, sei es durch Farbstoffreaktionen oder Klärung bei Präzipitation von DNA. Bei der Durchführung des Enzymnachweises aus dem menschlichen Serum erscheint die Verwendung elektrophoretischer und immunoelektrophoretischer Verfahren vorteilhaft. Diese Methoden ermöglichen eine durch die unterschiedliche Beweglichkeit im elektrischen Feld bedingte Auftrennung von Proteingemischen. Darüber hinaus dient die Immunelektrophorese in besonderem Maße zur Charakterisierung von Proteinen durch künstliche Antikörper. Bei Verwendung eines spezifischen Antiserums entsteht nämlich durch Diffusion auf dem Agargel eine Präzipitation mit dem entsprechenden Protein. Nach Ablauf dieser Reaktion wird die Heterogenität der verschiedenen Plasmafraktionen sichtbar. Kombiniert man diese Fraktionierung mit dem DNase-Nachweis aus dem elektrophoretisch getrennten Serum, so darf man neben der qualitativen Reaktion: Lokalisierung der DNase mit Hilfe eines spezifischen Antiserums in einer Serumfraktion, auch einen quantitativen Nachweis auf einem DNA-haltigen Agar erwarten. Diese Untersuchungen werden später hier ausführlich dargestellt. Es soll dabei auf folgende Fragen eingegangen werden:

- 1.) Können DNase-Aktivitäten des menschlichen Serums beim Gesunden und Kranken durch elektrophoretische Auftrennung näher in ihren Eigenschaften bestimmt werden ?
- 2.) Können mittels des DNase-Plattentestes Rückschlüsse auf die Aktivität der DNase im Serum gezogen werden ?
- 3.) Sind im Serum normaler und pathologischer Fälle Unterschiede in der Wirkung der DNase bezüglich der Aktivität vorhanden ?

II. DIE METHODIK

1. Möglichkeiten zur Darstellung von Proteinen.

Die im menschlichen Plasma als kolloide Teilchen mit einer Größe von 10^{-5} bis 10^{-7} cm gelöste Eiweißkörper unterscheiden sich jeweils durch ganz besondere Eigenschaften und lassen sich unter geeigneten Bedingungen voneinander abtrennen. Die einfachste Art der Trennung ist die Fällung der Proteine mit Salzen, z.B. Ammonium- oder Natriumsulfat, bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Man erhält drei Hauptfraktionen: 1. Das Fibrinogen, 2. das Serumglobulin, das selbst wieder in mehrere Fraktionen unterteilt werden kann, und 3. das Serumalbumin. Bemerkenswert ist, daß immer Gemische gefällt werden, die einer weiteren Aufteilung durch eine andere Methode bedürfen. Die Möglichkeit der Trennung von Eiweißkörpern auf Grund ihrer unterschiedlichen Form und Molekülgröße bietet die Ultrazentrifuge. Sie beruht auf der Tatsache, daß Teilchen mit einem größeren Molekulargewicht in einer Lösung schneller sedimentieren als leichtere Partikel. Auf die Verhältnisse beim menschlichen Plasma angewandt, bedeutet dies, daß die Sedimentation der Fadenmoleküle des Fibrinogens mit einem Mol.Gewicht von ca 500000 ziemlich rasch erfolgt, während die als Sphäroproteine bezeichneten Globulinmoleküle (Mol.Gewicht 150000-180000) und Albuminmoleküle (Mol.Gewicht etwa 60000-70000) wesentlich langsamer sedimentieren.

Eine andere Methode zur Differenzierung von Plasmaeweißkörpern gestattet die Elektrophorese. Auf Grund ihrer unterschiedlichen elektrischen Ladungen wandern die Proteine in einem elektrischen Feld verschieden schnell. Bei der freibeweglichen Elektrophorese nach Tiselius erfolgt die Auftrennung in einem U-Rohr. Die erhaltenen Gradienten lassen sich mit Hilfe einer optischen Messung als Kurven der Konzentration gegen die Wanderung darstellen. Bei neutraler Reaktion folgen in der Reihenfolge abnehmender Beweglichkeit dem Albumin, die Alpha-, Beta-, und Gammaglobuline. Zwischen den Beta- und Gammaglobulinen steht bezüglich der Wanderungsgeschwindigkeit das Fibrinogen.

In neuerer Zeit hat die Elektrophorese auf Trägermedien Bedeu-

tung erlangt. Als Trägermedien werden benutzt:

- a) Filterpapier
- b) Agargel
- c) Stärkegel
- d) Stärkeblock
- e) Zellulose-Acetat

Für die Durchführung unserer Versuche wurden ausschließlich die Papierelektrophorese und die Elektrophorese im Agargel angewendet. Die Papierelektrophorese ist beliebt wegen ihrer einfachen und schnellen Ausführbarkeit. Sie eignet sich besonders zur Charakterisierung des Reinheitsgrades. Die Auswertung erfolgt mit dem Extinktionsschreiber nachdem die Proteine entsprechend ihrer Konzentration angefärbt sind. Der Nachteil der Papierelektrophorese, die Unterscheidung von nur fünf Fraktionen, besteht bei der Elektrophorese im Agar nicht. Im Gegensatz zum Papier kommt es beim Agar als Trägermedium auf Grund seines großen Wassergehaltes und seiner Transparenz nicht zu einem Festhalten der Proteine. Da die Möglichkeit, elektrophoretisch Eiweißkörper in einer Mischung zu trennen, nur auf Unterschieden der Beweglichkeit im elektrischen Feld beruht, und Proteine, die in Form, Größe und Ladung, infolge verschiedener chemischer Zusammensetzung, sehr verschieden sind, die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit haben können, ist eine elektrophoretisch isolierbare Substanz, z.B. eine Plasmakomponente noch nicht ohne weiteres als homogen anzusehen (Schmidt 1955). Durch die zusätzliche Reaktion mit Antikörpern ist eine weitere Auftrennung möglich.

Die immunelektrophoretische Untersuchung liefert in erster Linie qualitative Resultate, das heißt, sie gibt an, ob bestimmte Serumproteine im untersuchten Serum vorhanden sind. Neben der qualitativen Beurteilung ist auch eine halb-quantitative möglich. Entsprechend den Gesetzen der Doppeldiffusion wird bei zunehmender Antigenmenge und gleichbleibendem Antikörpertiter die Präzipitationslinie in die Nähe des Antikörperreservoirs verschoben. Auch die Länge und die Dicke der Präzipitationslinie geben Hinweise auf die Antigenkonzentration im Serum (Wuhrmann, Märki 1963).

2. Durchführung der eigenen Versuche.

a) Die Immunelektrophorese

Für unsere Versuche wurde die Immunelektrophorese nach Grabar und Williams in der Mikromodifikation nach Scheidegger benutzt. Ein Objektträger (7,6 mal 2,6 cm) wird mit 2ml einer 1%igen Agarlösung in Michaelispuffer $\text{PH} = 8,2$ bedeckt, sodass eine etwa 1,5 mm dicke Agarschicht entsteht. In dem erstarrten Agar werden zwei kleine, runde Auftragsstellen (Durchmesser = 1,5mm) für das elektrophoretisch zu untersuchende Patientenserum ausgestanzt und mit Hilfe einer Mikropipette jeweils 0,005ml Serum eingefüllt. Auf die Enden des Objektträgers wird Filtrierpapier aufgelegt, das in die Pufferlösung hängt und damit die Verbindung zu den Elektroden herstellt. Eine zufriedenstellende Auftrennung der Eiweißkörper im Agargel wird erreicht in 2 Stunden 45 Minuten bei einer Spannung von 180 Volt und einer Stromstärke von 40mA für 8 Objektträger in zwei Elektrophoresekammern. Nach der elektrophoretischen Trennung wird parallel zur Wanderungsrichtung der aufgetrennten Proteine in der Mitte des Objektträgers ein etwa 1mm breiter Kanal ausgestanzt und mit 0,04ml Anti-Humanserum vom Kaninchen (Behringwerke) gefüllt. Bei Aufbewahrung der Objektträger in einer feuchten Kammer bei 4°C sind nach etwa 48 Std. die Immunpräzipitate sichtbar.

b) Die DNA-Platte

Zum Enzymnachweis aus dem Patientenserum dient als Substrat ein DNA-haltiger Agar. Diese Agarlösung enthält:

1,5 g Bacto-Agar

2,0 g Caseinhydrolysat

1,0 g Glucose

9,0 ml 0,5 molares MgCl_2

1,0 ml 0,5 molares CaCl_2

9,0 ml 0,1 molarer Trispuffer $\text{PH} = 7,4$

ad 100 ml aqua bidest.

Nach der Sterilisation im Dampftopf (20 Min.) werden 8ml des noch flüssigen Agars und 2ml DNA-Lösung (0,5%ige Seelachs DNA^{x)} in 0,145 mol. Natriumchlorid) (Kleinschmidt und Zahn 1959) in ein steriles Reagenzglas gegeben. Das so gewonnene Gemisch wird nun im Wasserbad 15 Minuten auf 98°C erhitzt (weil die DNA nicht steril gewonnen und abgewogen ist) und auf einem Nivelliertisch

^{x)} Präparat 1865 wurde von Prof. Dr. R.K. Zahn dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

in eine sterile Petrischale gegossen. Nach kurzer Zeit ist der Nähragar erstarrt. Zur Bestimmung der DNase-Aktivitäten aus dem Serum bieten sich mehrere Möglichkeiten:

1. Der Lochplattentest; ausgestanzte Löcher in der DNA-Platte werden mit einer bestimmten Menge des zu untersuchenden Serums gefüllt.
2. Das Auflegen von Agarblöckchen (Länge 9mm, Breite 4,5mm, Höhe 1,5mm) auf die DNA-Platte und das im Anschluß daran vorzunehmende Aufpipettieren der zu untersuchenden Flüssigkeit. Zur Erreichung von relativer Keimfreiheit während der Diffusionszeit werden die Agarblöckchen vorher für 15 Min. einer Bestrahlung mit UV-Licht ausgesetzt. Wir benutzten dazu einen Sterisolbrenner mit Reflektor in 80cm Abstand, die sterilisierende Strahlungsenergie betrug etwa $1000 \frac{\text{erg}}{\text{min. mm}}$. 2. Das Auflegen dieser Agarblöckchen auf die DNA-Platte erfolgte mit einer ausgeglühten Öse.
3. Das Auflegen von Agarblöckchen, die das elektrophoretisch getrennte Serum enthalten, auf die DNA-Platte nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben. Auch hier besteht die Notwendigkeit der UV-Bestrahlung zur Erreichung von Keimfreiheit. Die Diffusion der DNase in den DNA-haltigen Agar und die damit einsetzende hydrolysierende Wirkung der DNase erfolgt innerhalb der nächsten 24 Std. bei Zimmertemperatur. Dann wird die Petrischale mit 10 ml einer 1-normalen Salzsäure überschichtet, die überstehende Säure nach 5 Minuten abgegossen und die Agarschicht vorsichtig mit aqua bidest. abgespült. In diesem Zeitraum ist die Fällung nicht abgebauter DNA bis zum Grund der Platte durchgedrungen und optimal sichtbar. Während der nicht depolymerisierte DNA-Agar ein milchig trübes Aussehen hat, erscheint der Bereich, der der DNase-Wirkung ausgesetzt war, durchsichtig. Die ausgestanzten Löcher im DNA-Agar bzw. die Agarblöckchen sind von runden bzw. ellipsenförmigen Höfen umgeben.

c) Die Kombination der Immunelektrophorese mit dem DNase-Nachweis auf DNA-Platten

Wenn die Elektrophorese des Patientenserums im Agargel beendet und der Mittelkanal ausgestanzt ist, wird eine der beiden auf einem Objektträger sich befindenden Agarhälften abgetrennt und in 16 gleich große Agarblöckchen (Größe 9 mal 4,5mm, Höhe 1,5mm)

aufgeteilt. Die von Serum freien Randzonen des Agars werden verworfen. Auf die Agarblöckchen läßt man zur Erreichung von Keimfreiheit, wie vorhin beschrieben, UV-Licht einwirken und bringt sie anschließend auf eine mit DNA-Agar beschickte Petrischale. Bei Vorhandensein von DNase-Aktivitäten im Patientenserum bilden sich auf der DNA-Platte Höfe. Der Objektträger mit der anderen Agarhälfte wird schräg gestellt (in einem Winkel von ca 45°) zur besseren Diffusionsmöglichkeit, ohne Verlust des noch hinzugegebenen Antiserums. Durch direkten Vergleich der einen Seite der Immunreaktion mit den aufgeteilten Agarblöckchen können Beziehungen zwischen der auf der DNA-Platte sichtbaren Wirkung der DNase-Aktivitäten und den sich nach Zugabe des Antiserums noch ausbildenden Immunpräzipitaten hergestellt werden.

3. Eigene_Versuche.

a) Die Immunpräzipitate

Das zuerst von Grabar und Williams als Immunelektrophorese entwickelte Verfahren (Grabar und Williams 1953, 1955; Williams und Grabar 1955) ermöglicht eine zweifache Identifizierung der Proteine. Die Technik der zweidimensionalen Diffusion in Verbindung mit der elektrophoretischen Trennung der Antigene gestattet eine Unterscheidung der Proteine nach der verschiedenen elektrophoretischen Beweglichkeit einerseits und nach dem verschiedenen immunochemischen Verhalten der Antikörper gegenüber andererseits. Das bei diesem Versuch als Antikörper dienende Immunserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit Humanserum gewonnen. Es reagierte unter Bildung mehrerer Präzipitatlinien. Die Zahl und Stärke der auftretenden Linien hängt von der Qualität des benutzten Immunserums ab.

Bei der zweifachen Diffusion müssen beide, Antigen und Antikörper, zu einem gemeinsamen Reaktionsfeld wandern, ehe sie beginnen, einander zu präzipitieren. Das Antigen, das radiär von seinem Ursprung diffundiert, begegnet seinem homologen Antikörper, der vom Mittelkanal in gerader Front nach der Seite diffundiert. So bilden sich eine Reihe von Präzipitationslinien, deren Bogen auf dem transparenten Gel opak erscheinen.



Die Bildung spezifischer Präzipitate zwischen den elektrophoretisch aufgetrennten Antigenen und seinen Antikörpern (nach Scheidegger 1957)

Die Schnelligkeit der Ausbreitung von Antigen und Antikörper im halbfesten Medium, d.h. die Diffusionsgeschwindigkeit wird bestimmt von jeweiligen Bedingungen, mit charakterisiert durch die Diffusionskoeffizienten. Die Diffusion wiederum ist abhängig von der absoluten Konzentration und dem Molekulargewicht der Substanz; außerdem spielt die Temperatur des Systems eine Rolle. Besitzt das Antigen einen höheren Diffusionskoeffizienten als der Antikörper unter sonst gleichen Bedingungen, dann entsteht, von einem Diffusionszentrum ausgehend, ein abgeflachter Präzipitationsbogen, während bei einem niedrigen Diffusionskoeffizienten des Antigens, in Bezug auf den des Antikörpers, die Rundung des Präzipitates ausgeprägter erscheint. Die Antigenfraktionen können nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung eine der drei Formen haben: rund, symmetrisch ellipsoid oder asymmetrisch ellipsoid. Diese Form des Antigenflecks ist später für das Aussehen des entstehenden Präzipitatbandes maßgebend. Demzufolge sind die Präzipitationslinien halbkreisförmig, parabelförmig oder parabelförmig mit einem lang ausgezogenen Schenkel.



asymmetrisch
ellipsoid

symmetrisch
ellipsoid

rund

(nach Crowle 1961)

Zwei benachbarte Antigene sind identisch, wenn eine fortlaufende Präzipitationslinie entsteht. Sie sind verschieden, wenn sich die Präzipitationen kreuzen. Zwei sich teilweise identische benachbarte Antigene ergeben eine sich gabelförmig aufzweigende Präzipitationslinie (Scheidegger 1957).

Empfindlichkeit und Verschmelzung im immunoelektrophoretischen Versuch hängen nun auch von der Form des Auftragspunktes ab. Die Verhältnisse liegen bei einem runden und möglichst kleinen (punktförmigen) Auftragsloch am günstigsten. Eine ovale Auftragsstelle ergibt abgeflachte Präzipitationen mit größerer Verschmelzungstendenz. Die Zahl der Präzipitationslinien entspricht der Zahl der vorhandenen immunologisch homogenen Antigen-Antikörpersysteme. Durch die immunoelektrische Serumanalyse konnten im menschlichen Normalserum 18 Proteinindividuen durch spezifische Präzipitate charakterisiert werden; zwei elektrophoretisch schneller als Albumin wandernde Vorkomponenten, das Albumin, drei α_1 -Globuline, fünf α_2 -Globuline, vier β_1 -Globuline, zwei β_2 -Globuline und γ -Globulin (Schultze, Schwick 1957). Verwendet man statt des Antihumanserums vom Kaninchen ein anderes Immunserum, so lassen sich noch andere Fraktionen aufzeigen; z.B. Versuche mit Antihumanserum vom Rind von Burtin (1956) ergaben noch zusätzliche Fraktionen im Bereich der α_2 -Globuline. Untersuchungen über die Komponenten des normalen Humanserums wurden u.a. ausgeführt von Grabar und Burtin 1959, Hirschfeld 1960, Moretti et al. 1959, Scheidegger 1957, Scheiffarth and Götz 1960, Uriel u. Grabar 1956. Crowle (1961) berichtet von 29 verschiedenen Eiweißkomponenten im menschlichen Serum, denen mit Hilfe der Immunelektrophorese eine eigene Präzipitationslinie zugewiesen werden konnte. Allerdings war es nicht möglich, alle diese 29 verschiedenen Immunpräzipitate in einem Versuch aufzuzeigen. Im menschlichen Serum sind mehr Bestandteile, als in irgendeinem Versuch dargestellt werden konnte, da viele in so geringen Mengen vorhanden sind, daß sie erst bei 5-6facher Konzentration des Serums sichtbar werden, also nur unter besonderen Bedingungen in Erscheinung treten (Grabar et al. 1958). Andererseits bilden größere Fraktionen im konzentrierten Serum so breite Präzipitationsbänder, so daß sie diese kleineren Komponenten überdecken können (Grabar und Burtin 1959, Wunderly 1957). Bedingt durch wechselnde Antikörperbildung im jeweiligen Versuchstier (Kaninchen, Pferd, Rind) braucht ein Antiserum nicht Antikörper für alle Serumbestandteile zu enthalten, und ein zu untersuchendes Serum wird nicht alle bekannten normalen Bestandteile enthalten (Hirschfeld 1960, Scheidegger 1957).

b) Die Höfe auf der DNA-Platte

Durch die Wirksamkeit von DNase-Aktivitäten entsteht eine Depolymerisation der primär hochpolymeren DNA. Die aus sehr langen verdrehten Zwillings-Fäden bestehende DNA von hohem Molekulargewicht (bei extrahierten Zellkernen größer als 6 Millionen) wird dabei in einer der beiden oder in beiden Polynucleotidketten durch Querbrüche, und wahrscheinlich auch durch Abbrüche von den Enden abgebaut. Die Überschichtung mit 1n-Salzsäure führt zu einer durch das hohe Molekulargewicht der DNA bewirkten sichtbaren Ausfällung von noch nicht abgebauter DNA (Heinecke, Venner 1958). Das depolymerisierte Substrat nach DNase-Wirkung ist dann gekennzeichnet durch transparente Zonen im weißlich trüben Agargel. Die Größe der hervorgetretenen Höfe steht nun in Beziehung zur Fermentkonzentration. Die bei Verwendung von DNase-haltigen Agarblöckchen auftretenden ellipsenförmigen Höfe werden in ihren Durchmessern mit einem geeigneten Maßstab ermittelt. Auf diese Weise läßt sich mit Hilfe der DNA-Platte neben dem qualitativen Nachweis auch eine quantitative Bestimmung der DNase-Aktivitäten vornehmen.

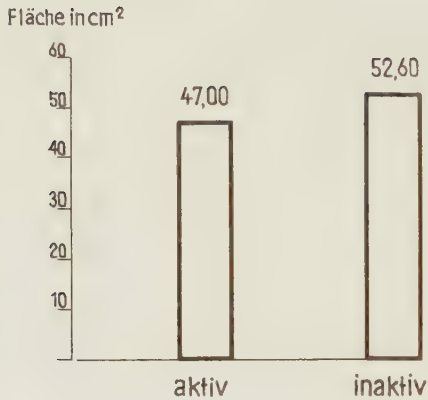
III. DIE ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

Nach der schon beschriebenen Methode, d.h. der Durchführung der Immunelektrophorese in Verbindung mit dem DNase-Nachweis auf DNA-Platten, wurde eine systematische Untersuchung von 28 verschiedenen Patientenserum vorgenommen, die, da bei diesen Patienten kein pathologischer Befund vorlag, als Normalserum bezeichnet werden. Bei einem Vergleich dieser jeweils in aktivem als auch in inaktivem Zustand (d.h. nach 30 Min. langem Erhitzen auf 56°C) vorliegenden Normalserum ergab sich zunächst ein Unterschied in Bezug auf die Größe der durch die DNase-Wirkung entstandenen Höfe auf der DNA-Platte.

Normalserum in inaktivem Zustand erzeugen größere Höfe wie es der nachstehenden Tabelle 1 zu entnehmen ist. Die einzelnen in der Tabelle aufgeführten Werte sind entstanden durch die Ausmessung der verschiedenen jeweils durch ein Patientenserum zustande gekommenen Hofflächen (cm^2) abzüglich der Flächen der betreffenden Agarblöckchen.

Serumprobe	Von Serum in aktivem Zustand gebildete Höfe in cm ²	Von Serum in inaktivem Zustand gebildete Höfe in cm ²
1	1,8	2,0
2	1,7	2,1
3	1,8	2,2
4	1,1	1,4
5	1,0	1,6
6	2,0	1,6
7	1,8	1,7
8	1,5	1,7
9	1,3	1,4
10	1,3	1,4
11	1,4	1,5
12	1,7	1,8
13	1,1	1,2
14	1,4	2,2
15	2,5	2,8
16	2,4	2,9
17	0,9	1,4
18	2,0	1,2
19	1,6	1,9
20	1,7	1,9
21	2,1	2,1
22	1,9	2,1
23	2,6	2,7
24	1,0	1,5
25	2,4	2,5
26	1,7	2,1
27	1,8	2,1
28	1,3	1,5

Tab. 1 Überblick über die Größe der Höfe, die bei Versuchen mit 28 verschiedenen, jeweils in aktivem und inaktivem Zustand vorliegenden Normalseren, zustande kamen.



Tab. 2 Vergleich der durch aktives und inaktives Normalserum entstandenen Hofflächen. Die Werte wurden durch Summation der Hofflächen aller dieser 28 Normalseren gefunden.

Dividiert man die Summe aller in Tab. 1 aufgeführten Hofflächen durch die Anzahl der untersuchten Seren, dann erhält man bei einem Normalserum in aktivem Zustand einen Mittelwert von $1,7\text{cm}^2$ für einen Hof, bei einem Normalserum in inaktivem Zustand einen Mittelwert von $1,9\text{cm}^2$ für einen Hof. Inaktiviertes Serum ruft eine prozentuale Vergrößerung der Höfe um 12% hervor.

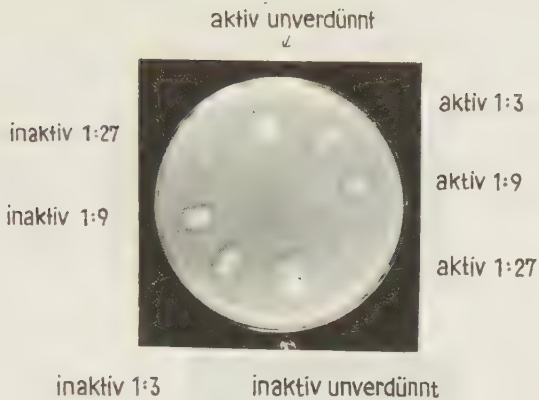


Abb. 1 DNase-Aktivitätsnachweis aus elektrophoretisch nicht getrenntem Normalserum in aktiver und inaktiver Form. In beiden Fällen wurde die Untersuchung mit unverdünntem Serum und in einer Verdünnungsreihe von 1:3, 1:9, 1:27 durchgeführt. Die Höfe hängen in ihrem Durchmesser von der DNase-Konzentration der auf die Agarblöckchen aufpipettierten Flüssigkeit ab.

Bei den Präzipitationserscheinungen der Immunelektrophorese war kein Unterschied zwischen Normalserum in aktivem und inaktivem Zustand feststellbar. In günstigen Fällen konnten wir 15 verschiedene Präzipitationsbogen unterscheiden. Nach längerem Aufbewahren der Objektträger über mehrere Tage bei 4°C waren die Präzipitate verstärkt und weiter ausgezogen.

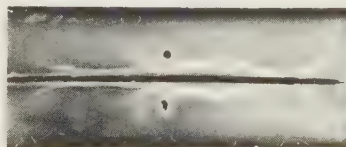


Abb. 2 Immunelektrophorese eines Normalserums

Für die nun folgenden Versuche zur Bestimmung der Lokalisation der Serum-DNase mit Hilfe der Immunelektrophorese in Verbindung mit dem DNase-Nachweis auf DNA-Platten und der Höhe der im Serum vorhandenen DNase-Aktivitäten, sichtbar durch Abbau des DNA-Agars, wurden ausschließlich Normalseren in inaktivem Zustand verwendet. Bei 57 untersuchten Normalseren traten jeweils auf der DNA-Platte Höfe im Bereich der Agarblöckchen 3, 4 und 5 auf, mit einem Maximum bei Agarblöckchen 4.

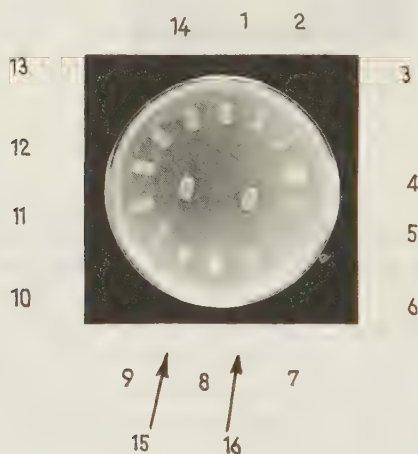


Abb. 3 Der Diffusionstest auf der DNA-Platte ergibt immer im Bereich der Agarblöckchen 3, 4 und 5 Höfe. Das Maximum liegt bei Agarblöckchen 4.

Das Entstehen dieser Höfe an immer der gleichen Stelle wird in Beziehung gebracht zu den präzipitierenden Antigen-Antikörperkomplexen auf dem mit Agar beschichteten Objektträger. Daraus ist ersichtlich, daß sich die Serum-DNase im elektrischen Feld in Richtung auf die Anode zu bewegt und daß sie im Bereich des α_1 -Globulins lokalisiert werden kann.

Die Tatsache, daß die DNase des Humanserums in Richtung der Anode wandert, läßt auf einen Überschuß an negativen Ladungen

schließen und einen isoelektrischen Punkt im alkalischen Bereich annehmen, der den PH-Wert des Michaelispuffers in den Elektrophoresekammern von 8,2 noch übertrifft.

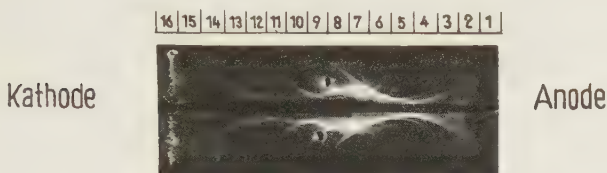


Abb. 4 Immunelektrophorese eines Normalserums. Es wird die Beziehung der Präzipitationslinien zu der Zahl der Agarblöckchen dargestellt.

Nachweisbar ist diese Serum-DNase nur in Kombination mit den DNA-Platten, da bei den Versuchen die Zuordnung einer Präzipitationslinie zu DNase-Aktivitäten nicht möglich war. Die durch Messung erhaltenen Werte der Hofgrößen variierten bei den einzelnen Normalseren. Bei einem Vergleich zwischen ihnen ergibt sich ein Anhalt auf die relative Wirksamkeit der in diesem oder jenem Serum vorhandenen DNase-Aktivität, bzw. auf die relative Menge der in diesem Serum enthaltenen aktiven DNase.

Tab.3 vermittelt einen Überblick über die durch Serum-DNase-Aktivität hervorgerufenen Hofflächen von 57 untersuchten Normalseren.

Serumprobe	Fläche des Hofes in cm ²	Serumprobe	Fläche des Hofes in cm ²
1	1,4	31	1,8
2	1,9	32	1,6
3	2,0	33	2,5
4	1,8	34	2,0
5	1,8	35	1,9
6	2,0	36	1,6
7	2,5	37	2,0
8	1,7	38	2,4
9	2,6	39	1,8
10	1,9	40	2,1
11	2,1	41	2,8
12	1,5	42	2,0
13	1,9	43	1,7
14	2,2	44	2,3
15	1,6	45	1,9
16	2,1	46	2,0
17	3,1	47	1,5
18	2,2	48	1,9
19	1,7	49	2,5
20	2,8	50	2,7
21	1,8	51	2,1
22	2,2	52	1,6
23	1,4	53	2,3
24	2,1	54	1,8
25	2,4	55	2,0
26	3,4	56	2,1
27	1,8	57	1,7
28	2,8		
29	2,0		
30	2,9		

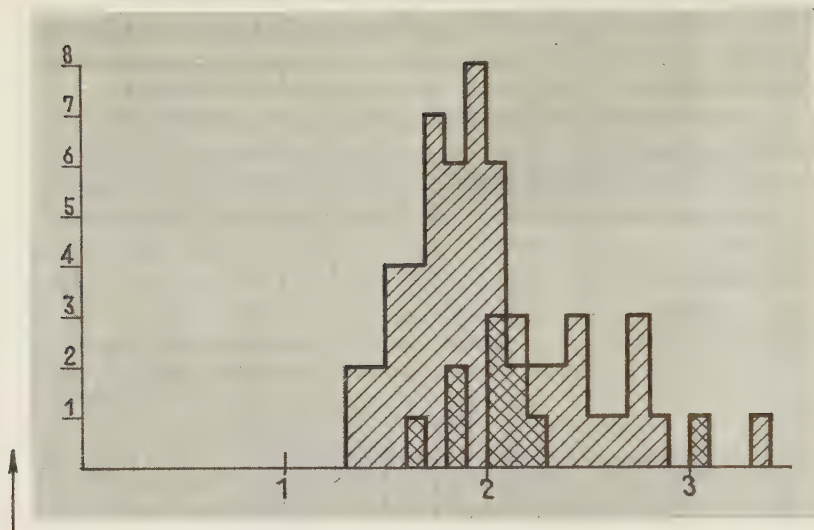
Auf Grund der Tatsache, daß Seren von erkrankten Patienten oft eine Veränderung der Plasmaproteine aufweisen, schien es angebracht, Versuche mit pathologischen Seren durchzuführen. Es wurden ausschließlich Seren von Tumorpatienten benutzt. Bei 10 untersuchten pathologischen Seren in inaktivem Zustand ergaben sich Werte für die Hofflächen, die etwas über den Werten der von inaktivem Normalserum erzeugten Höfen liegen. Der Mittelwert beträgt hier $2,2\text{cm}^2$ für einen Hof. Die prozentuale Vergrößerung der Höfe macht bei Versuchen mit pathologischen Seren im Vergleich zu den Werten beim Normalserum 18% aus.

Serumprobe	Befunde der Krankheiten bei den betr. Patienten	Von patholog. Seren gebildete Höfe in cm^2
1	Lungencarcinom	3,8
2	Lungencarcinom	2,1
3	Lungencarcinom	2,0
4	Mammacarcinom	2,3
5	Lungencarcinom	2,2
6	Lungencarcinom	2,2
7	Mammacarcinom	1,8
8	Magencarcinom	2,2
9	Lungencarcinom	2,3
10	Mammacarcinom	2,0

Tab. 4 Bei den 10 untersuchten, pathologisch veränderten Seren von Tumorpatienten ergaben sich durchschnittlich höhere Werte für die entstandenen Höfe.

Die auf der DNA-Platte durch Diffusion des Serums in Erscheinung tretenden DNase-Aktivitäten waren auch bei diesen Versuchen mit pathologischem Serum in Gegend der Agarblöckchen 3, 4 und 5 lokalisiert.

Die Abb. 5 zeigt einen Vergleich der Verhältnisse bei Normalseren und bei pathologischen Seren, die beide durch die Wirkung ihrer DNase-Aktivitäten gekennzeichnet sind.



Zahl N
der Seren

→ Hoffflächen F in cm^2 , äquivalent der DNase-Aktivität

Die hierzu benutzten Werte für Normalseren  sind der Tab. 3, die Werte für pathologische Seren  der Tab. 4 entnommen.

Die zugleich durchgeführte immunoelektrophoretische Plasmaanalyse des pathologischen Serums ergab, wie zu erwarten war, eine Abweichung von der Norm. Das Verhältnis der Proteine zueinander war verändert. Die Präzipitationslinien der Globuline schienen gegenüber der dem Albumin entsprechenden Präzipitationserscheinung verstärkt.

Um die Wirkung der DNase als DNA hydrolisierendes Enzym näher zu charakterisieren, wurden Versuche zur Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit der DNase auf DNA-Platten gemacht. Auf 5 verschiedene DNA-Platten wurden Agarblöckchen mit elektrophoretisch getrenntem Serum gebracht. Die DNA-Platten wurden nach 12, bzw. 24, 36, 48, 60 Std. mit 10 ml 1-normaler Salzsäure

überschichtet, die überstehende Säure nach 5 Minuten abgegossen und die Agarschicht vorsichtig mit aqua bidest. abgespült. Die DNA einer jeden Platte war also einer unterschiedlich langen Zeit der Diffusionswirkung der DNase ausgesetzt. Die dabei zustande gekommenen Höfe stehen größenmäßig in Beziehung zu der Einwirkungsdauer der DNase. Man findet eine lineare Abhängigkeit zwischen beiden.

Dauer der Diffusionswirkung in Std.	log	entstandene Höfe in cm^2
12	0,31	0,67
24	1,77	2,13
36	2,21	2,57
48	2,85	3,21
60	3,13	3,49

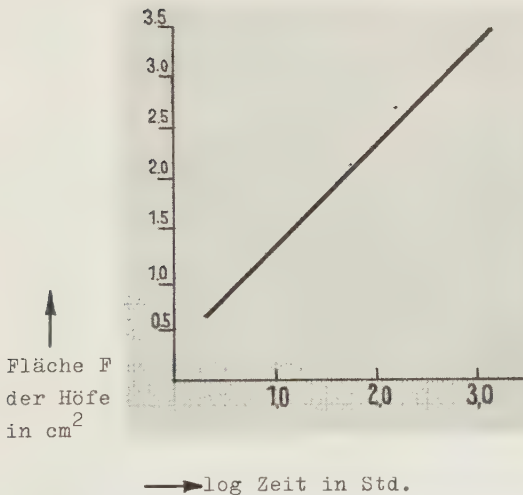


Abb. 6 Vergleich der durch verschieden lange Einwirkungs-
dauer des enzymhaltigen Serums auf den DNA-Platten
entstandenen Höfen.

Ein anderer Versuch zeigt, daß zwischen der Größe der entstandenen Höfe auf der DNA-Platte und der Menge des die DNase enthaltenden elektrophoretisch getrennten Serums keine zahlenmäßig festzulegende Proportionalität besteht. Für den Elektrophoresetest wurde eine Auftragsmenge von 0,005 ml bzw. 0,001 ml Serum benutzt. Die gemessenen Höfe auf der DNA-Platte stehen nicht der Serummenge entsprechend in einem Abhängigkeitsverhältnis.

Serumprobe	Auftragsmenge des elektr. getr. Serums	Entstandene Höfe in cm ²
1	0,005 ml	2,9
	0,001 ml	2,1
2	0,005 ml	4,3
	0,001 ml	2,7
3	0,005 ml	3,0
	0,001 ml	2,0

Tab. 5 Beziehungen zwischen den im Versuch benutzten unterschiedlich großen Mengen Patientenserum und den dadurch hervorgerufenen Höfen auf der DNA-Platte.

Zur Bestimmung der Aktivität der Serum-DNase diente ein Vergleich mit der uns in ihrem Wirkungsgrad bekannten Worthington-DNase I aus Rinderpankreas. Einem inaktivierten Mischserum (8 Normalseren) wurde Worthington-DNase I in der Verdünnung 6 γ /ml, 2 γ /ml, 0,6 γ /ml, 0,2 γ /ml, 0,06 γ /ml und 0,02 γ /ml Serum zugesetzt. Die Worthington-DNase I war in aqua dest. gelöst. Wie üblich wurde die elektrophoretische Trennung der Eiweißkörper im Agargel mit einer Auftragsmenge von 0,005 ml Serum durchgeführt. Nach 24 Std. langem Stehen bei Zimmertemperatur zeigten sich beim Übergießen mit Salzsäure auf der DNA-Platte deutlich sichtbare Höfe. Die durch die Serum-DNase hervorgerufenen Höfe lagen im Bereich der Agarblöckchen 3, 4 und 5 mit scharfer Abgrenzung gegen die umgebende DNA; das milchig trübe Aussehen deutet auf eine starke Ausfällung der Serumproteine hin. Durch Zugabe der Worthington-DNase I wurden klare, nicht deutlich abgrenzbare Höfe bei Agarblöckchen

7, 8, 9, 10 erzeugt. Diese Lokalisation läßt erkennen, daß die Worthington-DNase I während der elektrophoretischen Auftrennung im Agargel nur langsam wandert mit fast gleichmäßiger Diffusion in Richtung der Anode und Kathode.

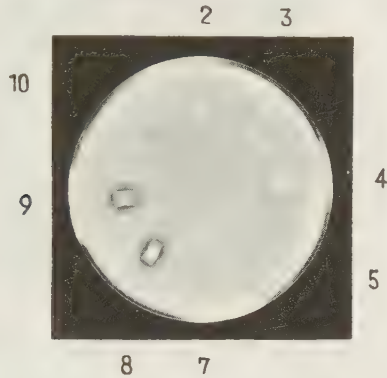


Abb. 7 Aktivitätenvergleich der DNase eines Mischserums mit der Worthington-DNase I nach vollzogener elektrophoretischer Trennung im Agargel.

Konzentration der zugesetzten Worthington-DNase γ /ml	Gesamtfläche der zustande- gekommenen Höfe in cm^2
6 γ /ml	5,0
2 γ /ml	3,9
0,6 γ /ml	1,3
0,2 γ /ml	0,5
0,06 γ /ml	+
0,02 γ /ml	+

Tab. 6 Beziehungen der einem Mischserum zugesetzten Worthington-DNase I-Lösung zur Größe der nach durchgeführter Elektrophorese entstandenen Höfe.

+ Spur außerhalb des Agarblöckchens

Das Mischserum ohne den Zusatz von Worthington-DNase I ergibt Höfe, deren Gesamtfläche $1,6\text{cm}^2$ beträgt. Dieser von $0,005\text{ml}$ Serum-DNase hervorgerufene Hof entspricht dem Hof, der von $0,005\text{ml}$ Worthington-DNase I $0,8\text{ } \gamma/\text{ml}$ erzeugt wird. Auf Grund des letzten Versuches ist also ein Vergleich der Aktivitäten der natürlichen Serum-DNase mit der Worthington-DNase möglich.

Um eine eventuell aufgetretene, durch andere Eiweißkörper des Serums verursachte Hemmung der Worthington-DNase I-Aktivität auszuschließen, führten wir folgenden Versuch durch: Ein künstlich hergestelltes 6%iges Serum (Albumin 5%, γ -Globulin 1%) mit einem Zusatz von Worthington-DNase I $6\text{ } \gamma/\text{ml}$ (gelöst in aqua dest.) wurde wie üblich der elektrophoretischen Trennung unterzogen. In Gegend der Agarblöckchen 7, 8, 9, 10 entstanden Höfe, die wie im vorhergehenden Versuch nicht getrübt, aber unscharf abzugrenzen waren. Die Messung ergab eine Gesamtfläche von $4,8\text{cm}^2$. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Wirkung der Worthington-DNase I-Aktivitäten auch im natürlichen Serum unverändert in Erscheinung tritt.

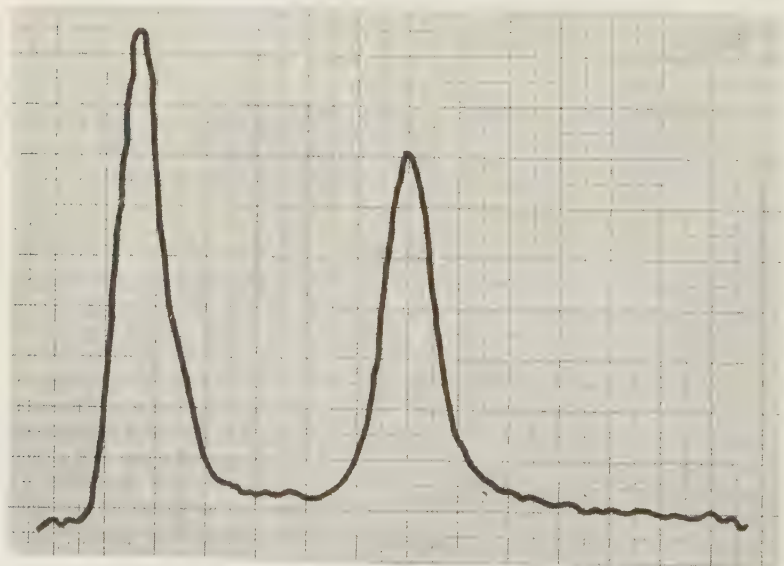


Abb. 8 Papierelektrophorese des künstlich hergestellten Serums. Der Zusatz von Worthington-DNase I

beträgt 6 γ /ml (in aqua dest. gelöst).

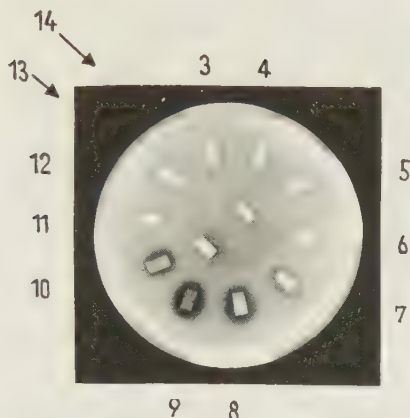


Abb. 9 Nachweis der einem künstlich hergestellten Serum zugesetzten Worthington-DNase I nach vorher durchgeführter elektrophoretischer Trennung.

Die Präzipitationslinien im Agargel unterschieden sich bei der Immunelektrophorese von künstlichem Serum mit Zusatz von Worthington-DNase I und bei der Immunelektrophorese von künstlichem Serum allein nicht. Eine Beziehung der Worthington-DNase I zu den präzipitierenden Antigen-Antikörperkomplexen ist nicht nachweisbar.

Zur Feststellung der Wirksamkeit der benutzten Worthington-DNase I führten wir einen Kontrollversuch durch. Je 0,005 ml Worthington-DNase I-Lösung (in aqua dest.) wurde in einer Verdünnungsreihe von 50 γ /ml, 25 γ /ml, 12 γ /ml, 6 γ /ml, 3 γ /ml, 1,5 γ /ml, 0,7 γ /ml und 0,4 γ /ml auf leere, sich auf einer DNA-Platte befindende, Agarblöckchen aufpipettiert. Nach 24 Std. langer Diffusion der Lösung hatten sich Höfe gebildet. Die Messung dieser Höfe ergab Werte, die bei graphischer Darstellung (Abb. 10) eine etwa lineare Abhängigkeit erlauben anzunehmen.

Konzentration der Worth.-DNase in aqua dest.	log C der Worth.-DNase I/ml	Fläche des Hofes in cm ²	$\sqrt{\text{Fläche}}$
50,0 γ /ml	1,69897	2,6	1,6
25,0 γ /ml	1,39794	1,8	1,3
12,0 γ /ml	1,07918	1,1	1,0
6,0 γ /ml	0,77815	0,6	0,8
3,0 γ /ml	0,47712	+	+
1,5 γ /ml	0,17609	+	+
0,7 γ /ml	0,84510-1	+	+
0,4 γ /ml	0,60206-1	+	+

Tab. 7 Ergebnis eines Verdünnungstestes mit einer selbst hergestellten Worthington-DNase I-Lösung.

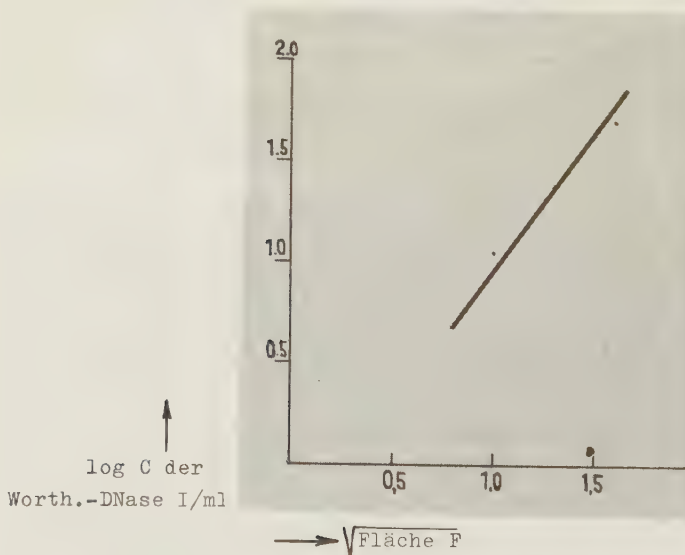


Abb. 10 Beziehungen zwischen der Größe der entstandenen Höfe und der Konzentration der benutzten Worthington-DNase I-Lösung.

+ Spur DNase-Wirkung

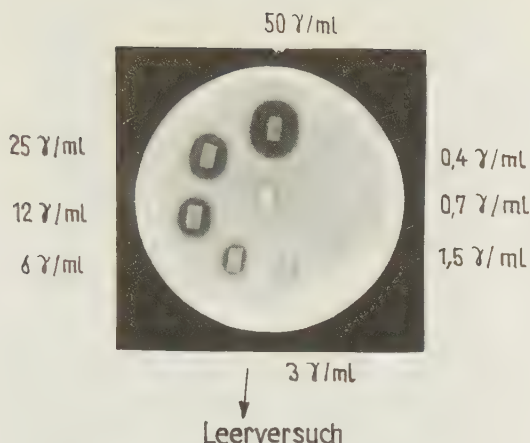


Abb. 11 Die Aktivitäten der in einer Verdünnungsreihe verwendeten Worthington-DNase I-Lösung werden im Diffusionstest sichtbar.

Mit Hilfe dieses Versuches lassen sich auf Grund der Kenntnis über die zur Erzeugung von Höfen bestimmter Größe notwendige Menge Worthington-DNase I Rückschlüsse auf die im normalen Humanserum tatsächlich vorhandenen DNase-Aktivitäten ziehen. Die von der Serum-DNase erzeugten Höfe, deren Größe für jeweils ein Serum zwischen den Werten von $1,4\text{cm}^2$ - $3,4\text{cm}^2$ liegt, entsprechen beim Vergleich mit dem vorangegangenen Versuch den Höfen, die von der Worthington-DNase I hervorgerufen wurden mit der Konzentration von etwa 20 γ /ml - 65 γ /ml. Das bedeutet, daß in 0,005 ml Humanserum DNase-Aktivitäten enthalten sind, die in ihrer Wirkung mit der gleichen Menge einer Worthington-DNase I-Lösung in einer Konzentration von 20 - 65 γ /ml gleichzusetzen sind.

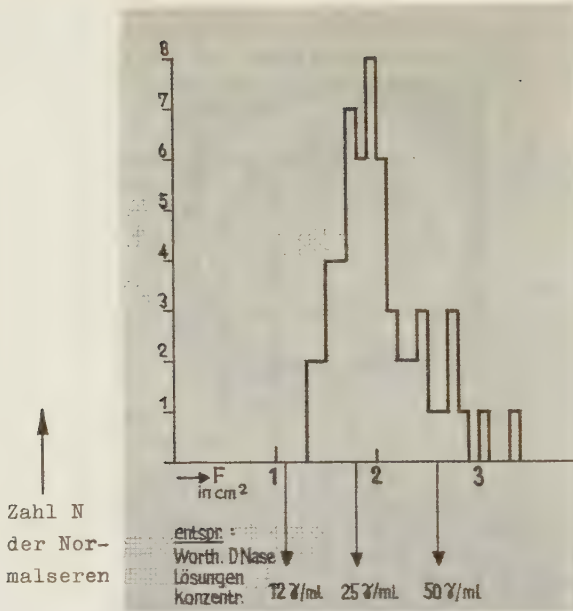


Abb. 12 Die Wirkung der DNase-Aktivitäten, die im Normalserum des Menschen vorhanden sind, wird in Zusammenhang gebracht mit der Wirkung der Aktivitäten unserer hergestellten Worthington-DNase I-Lösung. Es erfolgt die größenmäßige Zuordnung der von der DNase des Patientenserums erzeugten Höfe zu den entsprechenden Höfen, die von der Worthington-DNase I gebildet wurden. Die eingetragenen Werte der Hoffflächen F in cm^2 für die Normalseren entstammen der Tab. 3, die für die Worthington-DNase I-Lösung der Tab 7.

IV. DISKUSSION

Bei der Untersuchung von DNase-Aktivitäten im Serum von Patienten oder Gesunden bestand immer die Schwierigkeit, Hemmstoffe auszuschalten. Durch den Nachweis von solchen Enzym-Aktivitäten des elektrophoretisch getrennten Serums im Agar war es einmal möglich, bessere Vergleiche von verschiedenen Seren anzustellen, und zum anderen zu versuchen, Zuordnungen der DNase-Reaktion zu schon beschriebenen Fraktionen des Serums durch Immunelektrophorese und den DNase-Plattentest zu erhalten. Heinecke und Venner haben zum ersten Mal von dem Plattentest mit Hilfe von DNA-haltigem festen Agar Gebrauch gemacht.

Der Verbrauch von DNA sollte dabei eingeschränkt werden, wegen der Schwierigkeit, geeignete DNA zu gewinnen und gleiche Präparate zur Reproduktion zu erhalten. Es hat sich hierbei als günstig erwiesen, daß die DNA, im Agar 0,1% gemischt, nochmals für 15 Minuten erhitzt wurde, da dadurch klare Randzonen und größere Höfe, im Vergleich mit der Original-Methode von Heinecke und Venner, erhalten wurden. Die verschiedenen Ansätze führten dann zur Verwendung aufgelegter Agarblöckchen, deren Gehalt an DNase-Aktivitäten durch Flächenbestimmung im umgebenden Diffusionsgebiet ermittelt wurde. Zusatz von bivalenten Kationen (Mg^{++} und Ca^{++}) sollte, ähnlich wie bei Pankreas-DNase, volle Wirksamkeit gewährleisten.

Eine Lokalisierung der DNase-Aktivitäten war möglich durch Aufteilung des elektrophoretisch zerlegten Serums im Agar und gleichzeitig durch den Nachweis von Immunpräzipitationen des gleichen Serums im benachbarten Agarstreifen mit geeigneten Kaninchen-Anti-Humanseren. Hier trat mit hoher Konstanz ein gleichartiges Verhalten der anodisch wandernden Enzymaktivitäten auf, sodaß die Zuordnung zu den α_1 -Globulinen keine Schwierigkeiten bereitete. Die Beziehung zu quantitativen DNase-Mengen dagegen war nicht sicher zu stellen. Deswegen wurden nur Äquivalent-Aktivitäten von Pankreas-DNase angegeben. Sie sind im Serum von Gesunden, im Mittel etwa 30 γ /ml, der Pankreas-DNase vergleichbar; letztere tritt jedoch elektrophoretisch an anderer Stelle auf, nämlich mehr zu den β -Globulinen hin verschoben. Ob nun bei Seren von Tumorkranken

(6 Lungen(Bronchial)-Carcinome, 3 Mamma-Carcinome, 1 Magen-Carcinom) höhere Aktivitäten als bei Gesunden vorkommen, läßt sich auf Grund der kleinen Zahlen und der Seltenheit einer solchen Untersuchung nicht mit Bestimmtheit sagen. Die in unserem Material gefundene Erhöhung dieser 10 Patienten-Seren um im Mittel 18% läßt jedoch erwarten, daß größere Untersuchungsreihen, mit systematischer Analyse des zeitlichen Ablaufes und der Krankheitssymptome, weitere Erkenntnisse über die DNase-Aktivitäten im menschlichen Serum zeitigen werden. Solche Untersuchungen waren jedoch hier, wegen des nicht unbeschränkten DNA-Materials, nicht möglich.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Desoxyribonuclease (DNase)-Aktivitäten im Serum können durch den Agargeldiffusionstest durch Hydrolyse von hochpolymerer DNA nachgewiesen werden. Da dieser auf der HCl-Präzipitation nicht abgebauter DNA beruht, stört präzipitierendes Serum, sodaß eine elektrophoretische Auftrennung notwendig ist. Zum Nachweis der Lokalisation des Enzyms wurden zugleich immunoelektrophoretische Versuche gemacht. Dabei ergab sich, daß die DNase-Aktivitäten des aktiven und inaktiven Serums in der Fraktion der α_1 -Globuline liegen.

Eine immunoelektrophoretische Präzipitationslinie läßt sich dem Enzym nicht zuordnen. Von 28 jeweils in aktivem und inaktivem Zustand untersuchten Seren wurden im Mittel DNase-Aktivitäten gefunden, die in ihrer Wirkung einer DNase (Worthington)-Lösung (aus Rinderpankreas) in einer Konzentration von 24 γ /ml (für aktives Humanserum) und 27 γ /ml (für inaktives Humanserum) entsprechen.

Normale und pathologische Seren unterschieden sich in ihren DNase-Aktivitäten. Pathologische Seren von Tumorkranken besitzen im Mittel DNase-Aktivitäten, die mit einer Worthington-DNase I-Lösung in einer Konzentration von 31 γ /ml gleichzusetzen sind. Die prozentuale Vergrößerung der auf der DNA-Platte gemessenen Abbauzonen beträgt bei den pathologischen Seren gegenüber den Normalseren 18%.

LITERATUR

- Abramson, H.A.,
Moyer, L.S. u.
Govin, M.H. Electrophoresis of Proteins,
Reinhold Publ. Corp., New York (1942)
- Behringwerke Plasmaderivate,
Behringwerke AG, Marburg-Lahn
- Bennhold, H. Die Eiweißkörper des Blutplasmas
Kylin, E. u. Dresden, Leipzig (1938)
Rusznýák, St. 220-230 Die Vehikelfunktion der
Bluteiweißkörper
369-376 Serumeiweiß und serologische
Reaktionen
- Biguet, J., Ann. Inst. Pasteur 100, (1961) 13-24
Havez, R., Etude Electrophorétique, Chromato-
Tran van Ky u. graphique et Immunologique des
Degaey, R. Antigènes de Candida albicans
- Crowle, A.J. Immunodiffusion
Academic Press New York and London (1961)
60-86 Double Diffusion
86-95 Immuno-electrophoresis
95-109 Fluid and Cellular Constituents
109-121 Pathology
229-243 Immuno-electrophoresis
- Engström, A.u. Biological Ultrastructure
Finean, J.B. Academic Press New York (1958)
260-272 Role of nucleic acids
- Grabar, P. Immunopathologie
Basel, Stuttgart (1959)
Le problème de l'autoantigénicité
- Grabar, P. Behringwerk-Mitteilungen 35 (1958) 19-32
Die Entstehung der Antikörper

- Grabar, P. u. Masson, Paris (1960)
 Burtin, P. L'analyse immunoélectrophorétique
- Grabar, P. u. Biochem. Biophys. Acta 10 (1953) 193-194
 Williams, C. Méthode permettant l'étude conjuguée
 des propriétés électrophorétiques et
 immunochimiques d'un mélange de protéines
- Grabar, P. u. Biochem. Biophys. Acta 17 (1955) 67-70
 Williams, C. Méthode immunoélectrophorétique
 d'analyse de mélanges de substances
 antigéniques
- Habich, H. Schweiz. med. Wschr. 83 (1953) 1253-1256
 Zur Antigenanalyse der Paraproteine
 bei Makroglobulinämien
- Harper, H.A. Review of Physiological Chemistry
 Lange Medical Publications Los Altos
 California (1961)
 120-128 The Plasma Proteins
- Heinecke, H. u. Z. Naturforschung 13b (1958) 576-579
 Venner, H. Quantitative Bestimmung von
 Nucleasen
 2. Mitteilung DNasen
- Hirschfeld, J. Science Tools 7 (1960) 18-25
 Immuno-electrophoresis
- Hirszfeld, L. u. Schweiz. Z. Path. 17 (1954) 73
 Dubiski, St. Untersuchungen über die Struktur der
 inkompletten Antikörper
- Hitzig, W.H. Schweiz. med. Wschr. 51 (1960) 1449-1452
 Praktische und theoretische Ergebnisse
 neuerer Bluteiweißkörperuntersuchungen
- Kanzow, U. Klin. Wschr. 33 (1955) 1043-1046
 Serolog. Differenzierung von
 Makroglobulinämien

- Karlson, P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für
Mediziner und Naturwissenschaftler
Thieme Verlag Stuttgart (1964) 3. Aufl.
89-111 Nucleinsäuren und Protein-
Biosynthese
- Kleinschmidt, A.K. Z. Naturforschung 14b (1958) 770-779
Zahn, R.K. Über Desoxyribonucleinsäure-Molekeln
in Proteinmischfilmen
- Lehnartz, E. Chemische Physiologie
Springer Verlag Berlin Göttingen
Heidelberg (1959)
189-196 Stoffwechsel der Nuclein-
substanzen
- Martin, E. u. Schweiz. med. Wschr. 87 (1957) 439-442
Scheidegger, J.J. Myélomatose diffuse et immuno-
électrophorèse
- v. Mural, G., Schweiz. med. Wschr. 87 (1957) 467-470
Barandun, S. u. Die Antiglobulinhemmungsreaktion
Hässig, A. als Untersuchungsmethode bei Hypo-
und Agammaglobulinämien
- Nennstiel, H.J. u. Klin. Wschr. 35 II (1957) 689
Becht, TH. Über das erbliche Auftreten einer
Albuminspaltung im Elektrophoresedia-
gramm
- Schaub, F. Schweiz. med. Wschr. 83 (1953) 1256-1257
Gleichzeitiges Vorkommen von Makro-
globulinämie Waldenström und von
malignen Tumoren
- Schaub, F. Schweiz. med. Wschr. 82 (1952) 890-895
Zum Krankheitsbild und zur Differen-
tialdiagnose der Makroglobulinämie
Waldenström

- Scheidegger, J.J. Bull.soc. chim. biol. (1957)
Suppl.n.I
L'Analyse Immuno-Electrophorétique
Des Liquides Biologiques
- Scheidegger, J.J. Int. Arch. Allergy, N.Y. 7 (1955) 103-110
Une micro-méthode de l'immunoélectrophorese
- Scheiffarth, F.,
Berg, G. u.
Götz, H. Papierelektrophorese in Klinik und Praxis
Urban Schwarzenbergverlag München,
Berlin (1962)
- Scheiffarth, F. u.
Frenger, W. Immunohämatologie, Fortschritte der
Immunitätsforschung
Steinkopffverlag Darmstadt (1961)
- Scheiffarth, F.,
Frenger, W. u.
Götz, H. Klin. Wschr. 36 (1958b) 367-369
Immunelektrophoretische Studien am
Properdin-Zymosan- u. Properdin-Inulin-
Komplex
- Scheiffarth, F. u.
Götz, H. Int. Arch. Allergy 16 (1959) 61
Die Bedeutung der Immunelektrophorese
bei der Differenzierung pathologischer
Seren
- Scheiffarth, F.,
Götz, H. u.
Frenger, W. Ärztl. Wschr. 11 II (1956) 573-575
Möglichkeiten und Grenzen der
Immunelektrophorese
- Scheiffarth, F.,
Götz, H. u.
Soergel, K. Klin. Wschr. 36 (1958a) 82-86
Immunelektrophoretische Studien an
Myelomseren
- Schmidt, H. Fortschritte der Serologie
2.Aufl.Verlag Steinkopff Frankfurt/M
(1950)
I. Kap. Antigene
II. Kap. Der Antikörper
III.Kap. Die Antigen-Antikörper-Bindung
IV. Kap.H. Tumoren

- Schmidt, G. in
Chargaff, E. u.
Davidson, J.N. (ed.s.) The nucleic acids. Chemistry and Biology
Academic Press New York (1955)
Nucleases and nucleic acids attacking
enzymes
- Schmitz, E. Lehrbuch der chem. Physiologie
Johann Ambrosius Barth Verlag Leipzig
(1958)
168-197 Die Nukleinkörper
250-270 Die Fermente
- Schultze, H.E. u.
Schwick, G. Behringwerk-Mitteilungen 33 (1957) 11-36
Immunelektrophoretische Studien
- Schultze, H.E. u.
Schwick, G. Behringwerk-Mitteilungen 35 (1957)
Quantitative immunolog. Bestimmung
der Plasmaproteine
- Steigerwald, H.
Spielmann, H.W.,
Fries, H. u. Grebe, S.F. Klin. Wschr. 38 (1960) 973-980
Neuere Untersuchungen über die
Antigenwirkung des Insulins
- Straub, F.B. Biochemie
Verlag der Ung. Akademie d. Wissen-
schaften Budapest (1960)
92-132 Enzyme
309-334 Nukleinsäuren
- Uriel, J.
Götz, H. u.
Grabar, P. Schweiz. med. Wschr. 87 (1957) 431-434
Etude de la céruloplasmine du sérum
humain par l'électrophorèse en gélose
et l'analyse immuno-électrophorétique
- Waldenström, J. Schweiz. med. Wschr. 78 (1948) 927-928
Zwei interessante Syndrome mit
Hyperglobulinämie
- Wiedemann, E. Die Bluteiweißkörper des Menschen
herausgegeben v. Wuhrmann, F. u.
Wunderly, Ch.
Benno Schwabe & Co Verlag Basel (1947)
146-153 Reaktions-Konstellationen
156-163 Plasma- u. Serumeiweißreaktionen

- Wieme, R.J. Behringwerk-Mitteilungen 34 (1958) 27-37
Über einige Aspekte der Elektro-
phorese im Agar-Gel
- Williams, J.C.A.u. J. Immunol. 74 (1955) 158-167
Grabar, P. Immuno-electrophoretic studies of serum
proteins. The antigens of human serum.
J. Immunol. 74 (1955) 397-403
Immune sera: antibody distribution
J. Immunol. 74 (1955) 404-410
Human gamma globulin
- Wuhrmann, F. Schweiz. med. Wschr. 82 (1952) 937-940
Einige aktuelle klin. Probleme
über die Serum-Globuline
- Wuhrmann, F. u.
Märki, H.H. Dysproteinämien u. Paraproteinämien
Benno Schwabe & Co Verlag Basel,
Stuttgart (1963)
227-251 Fraktionierung der Serumproteine
282-287 Reaktionskonstellationen des
Serumproteinbildes
- Wuhrmann, F. u.
Wunderly, Ch. Die Bluteiweißkörper des Menschen
Benno Schwabe & Co Verlag, Basel (1957)
- Wuhrmann, F. Dtsch. med. Wschr. 74 (1949) 481-485
Wunderly, Ch. u. Über Bluteiweißuntersuchungen
Hugentobler, F. bei 60 Fällen von Plasmocytom u.
ihre klin. Bedeutung
- Wuhrmann, F.,
Wunderly, Ch. u.
Wiedemann, E. Schweiz. med. Wschr. 78 (1948) 180-182
Über das Alpha-Globulin-Plasmocytom
- Wunderly, Ch. in:
Alexander, P. u.
Block, R.J. (ed.s) Composition, structure and reactivity
of proteins. A laboratory manual of
analytical methods of protein chemistry
(including polypeptides)
Vol.2.
Pergamon Press Oxford, London, New York,

- Paris (1960)
232-243 The technique of immunoelectrophoresis in agar-gel
- Wunderly, Ch. Dtsch. med. Wschr. 83 (1958) 407-410
Die Immunelektrophorese
- Wunderly, Ch. u. Bustamante, V. Klin. Wschr. 35 (1958) 758-760
Eine verbesserte Technik der Elektrophorese im Agargel
- Wunderly, Ch. u. Piller, S. Klin. Wschr. 32 (1954) 425-432
Die Färbung der im Blutserum enthaltenen Proteine, Lipide u. Kohlenhydrate nach Papierelektrophorese
- Zahn, R.K. Kolloid-Zeitschrift 169 (1960) 168-170
Kleinschmidt, A.K. Biochemisches Verhalten von Desoxy-
Gehatia, M. ribonukleinsäure
- Zöllner, N., Dtsch.med.Wschr. 74 (1949) 486-488
Eymmer, K.P. u. Möglichkeiten u. Grenzen der Elektrophorese in der Pathophysiologie der
Scheid, L. Plasmaeiweiße

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern des elektronen-mikroskopischen Laboratoriums im Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt/M. unter der Leitung ihres Direktors, Herrn Prof. Dr. K. H e r z b e r g für die freundliche Unterstützung bei meinen Versuchen danken. Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. A. K l e i n s c h m i d t für die Überlassung des Themas und die wertvollen Hinweise und Anregungen bei der Arbeit. Weiterhin möchte ich auch Herrn Prof. Dr. R. K. Z a h n vom Institut für vegetative Physiologie der Universität in Frankfurt am Main für das zur Verfügung gestellte Material meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel
"Studien zum elektrophoretischen und immunoelektrophoretischen Nachweis von Desoxyribonuclease-Aktivitäten im Patientenserum"
im Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt/Main unter Leitung von
Prof. Dr. A. K. K l e i n s c h m i d t
ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt/Main, den 12.Juli 1965

Helga Hank

Mein Lebenslauf !

Ich wurde am 22. Mai 1937 in Kaiserslautern als Tochter des Reichsbahnrates Hans Kneidl und dessen Ehefrau Katharina geboren.

In Frankfurt/Main besuchte ich die Anna-Schmidt-Schule, ein Realgymnasium für Mädchen, und erwarb dort am 28. Februar 1957 das Zeugnis der Reife.

Im Sommersemester 1957 begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main und legte im Sommersemester 1963 an dieser Universität mein Staatsexamen ab.

Seit dem 1. März 1962 bin ich mit dem Zahnarzt Dr. Paul Hauk verheiratet.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Prof. Dr. A. K. Kleinschmidt

Prof. Dr. J. v. Reckow

Prof. Dr. M. Kuck

Prof. Dr. P. Hauser

Dr. W. Koller

Prof. Dr. W. Sandritter

Prof. Dr. E. Westermann

Prof. Dr. G. K. Steigleder

Prof. Dr. H. Martin

Privatdozent Dr. W. Ristow

Privatdozent Dr. W. Weber

Prof. Dr. D. Starck

Prof. Dr. K. Wezler

Prof. Dr. E. Heinz

